

# 第二高調波発生光 (SHG) 顕微鏡の小型化

○厚田耕佑, 安井武史

徳島大学 大学院 先端技術科学教育部

# 皮膚計測

**皮膚** ヒトの身体全体を覆う

体重の約16%を占める ⇒ **人体最大の臓器**とも呼ばれる

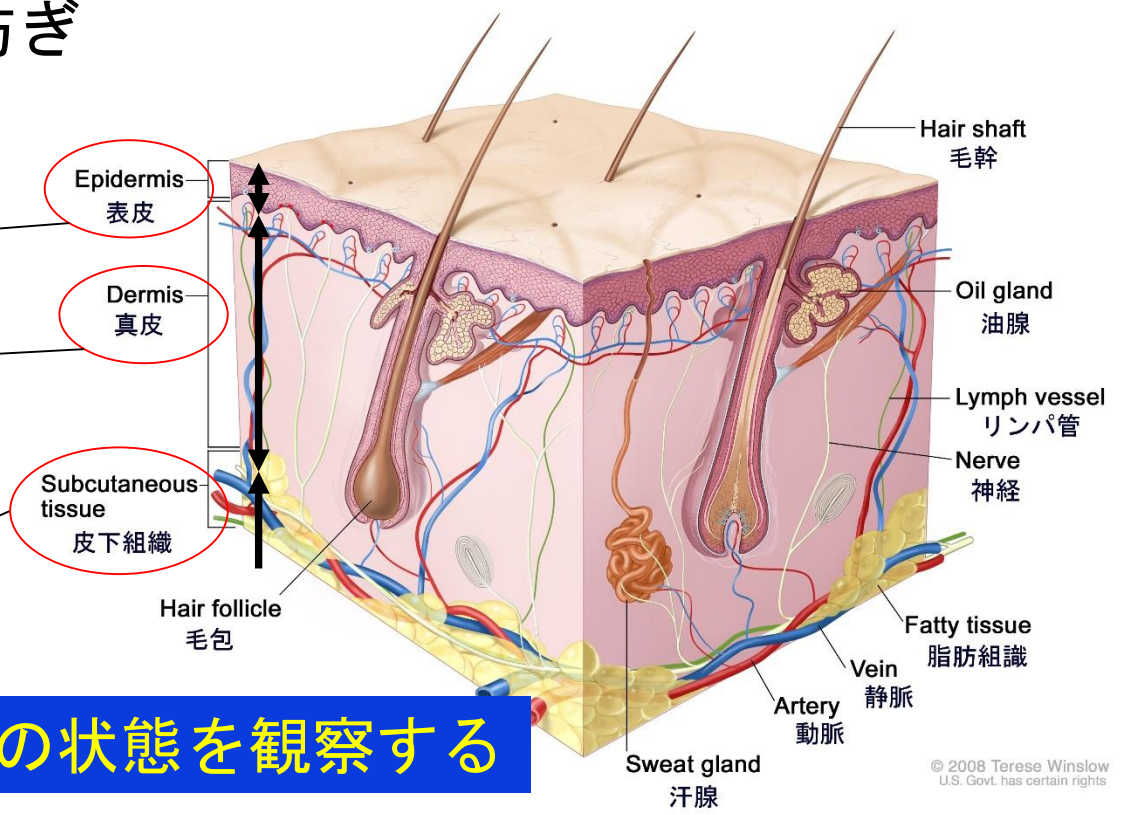
人体に害となる侵入を防ぎ  
水分(体液)を保つ

表皮 (0.06~0.2mm)

真皮 (2mm)

**コラーゲン** : 約70wt%

皮下組織 (皮下脂肪)



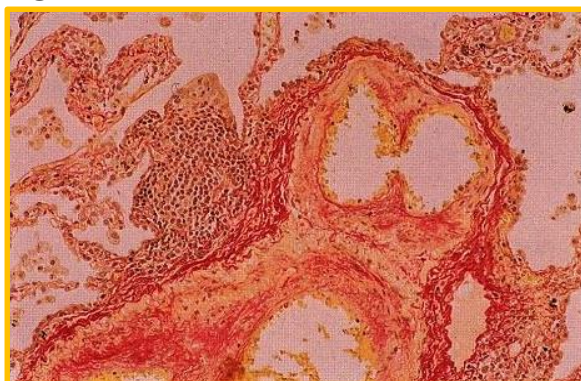
**真皮コラーゲンから皮膚の状態を観察する**

© 2008 Terese Winslow  
U.S. Govt. has certain rights

# 従来のコラーゲン観察

## 染色法

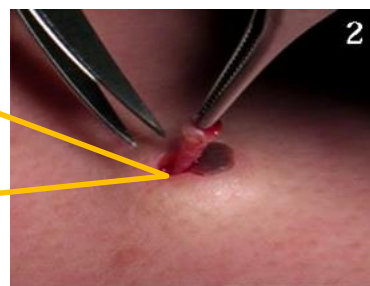
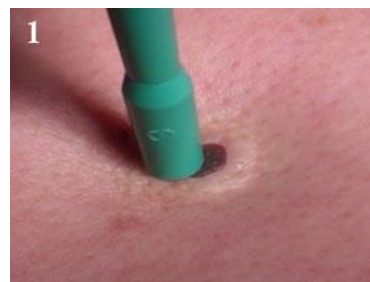
e.g. : Van Gieson staining



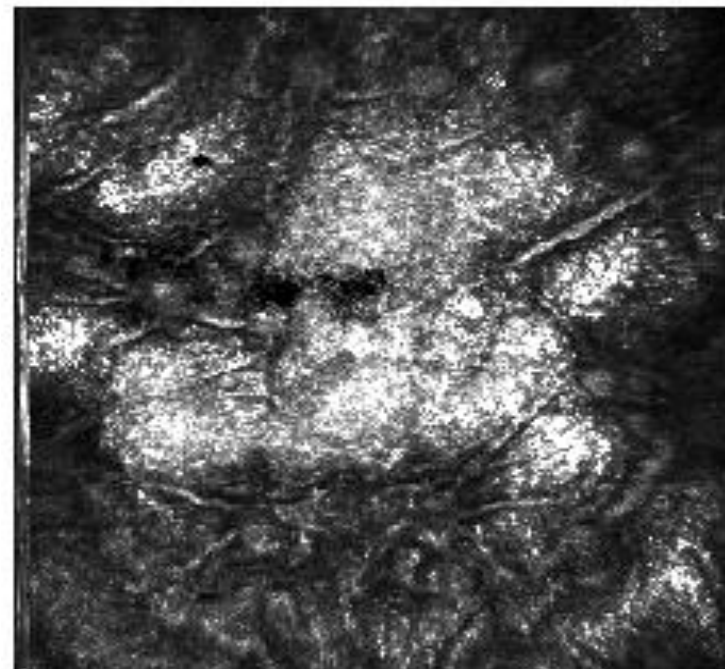
(Collagen= Red)

<http://www.soarer.hoken.med.yamaguchi-u.ac.jp>

選択的観察  
侵襲的(生検)



## 共焦点顕微鏡



低侵襲  
分子選択性なし

コラーゲンを“生きたありのまま”で観察することは困難であった

# 生体コラーゲンSHG顕微鏡

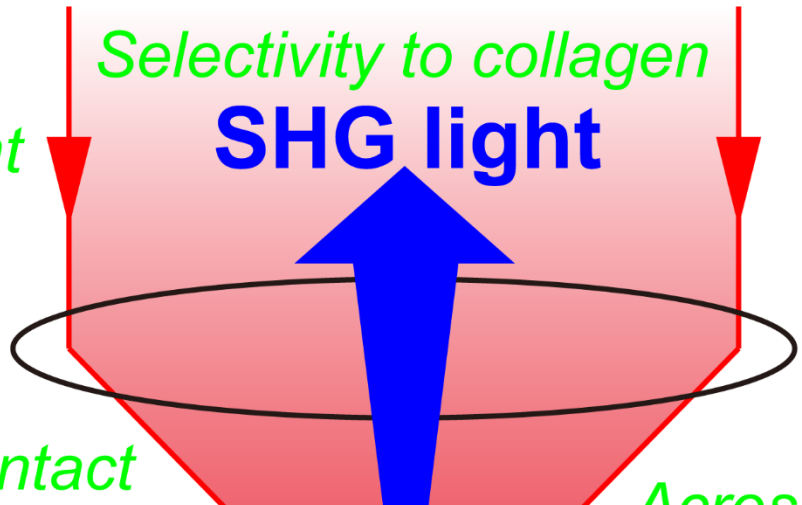
コラーゲン線維  
を選択的に観察

Femtosecond laser light

Selectivity to collagen

SHG light

- Free from BG light
- Reflection light
  - Scattering light
  - Fluorescence



Epidermis  
(no collagen)

Non-contact

Across epidermis

Dermis  
(70 wt% collagen)

Non-staining  
Deep penetration  
Low-invasion

SHG spot  
( $\phi < \text{a few } \mu\text{m}$ )

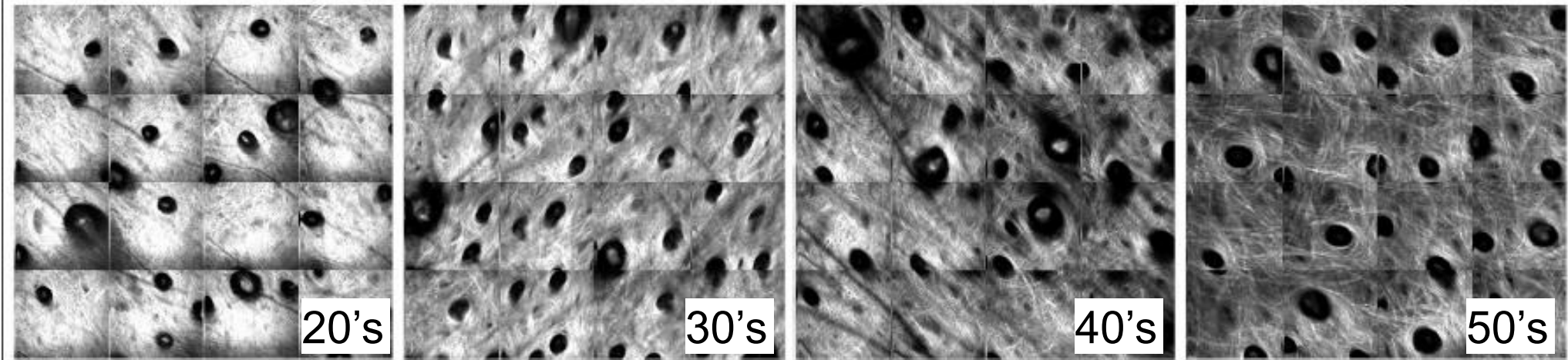
Subcutis  
(no collagen)

in vivo

High spatial resolution  
3D imaging

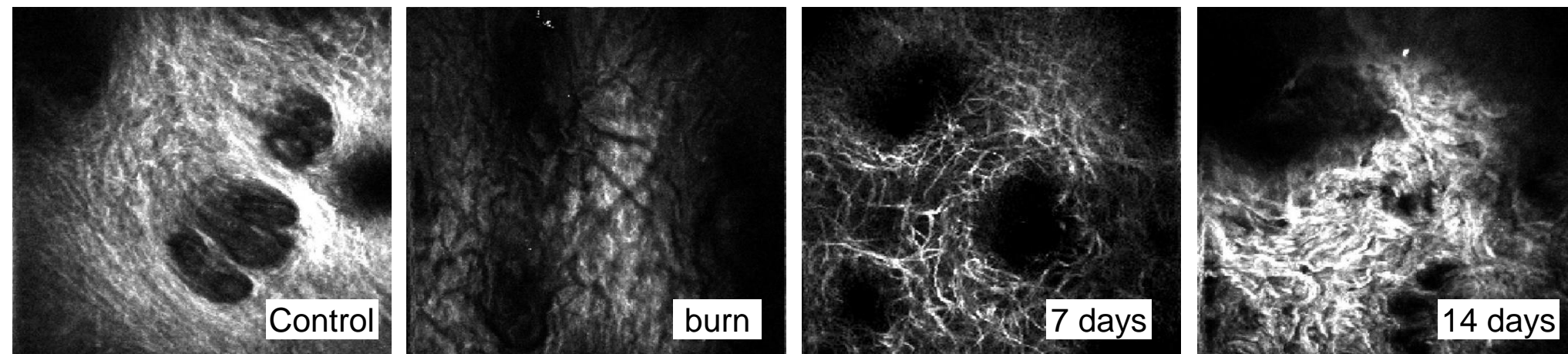
# SHG顕微鏡の *In situ* 観察

## 加齢によるヒト頬皮膚コラーゲンの構造変化



ref) T. Yasui et al. , *J. Biomed. Opt.* **18**, 031108 (2013).

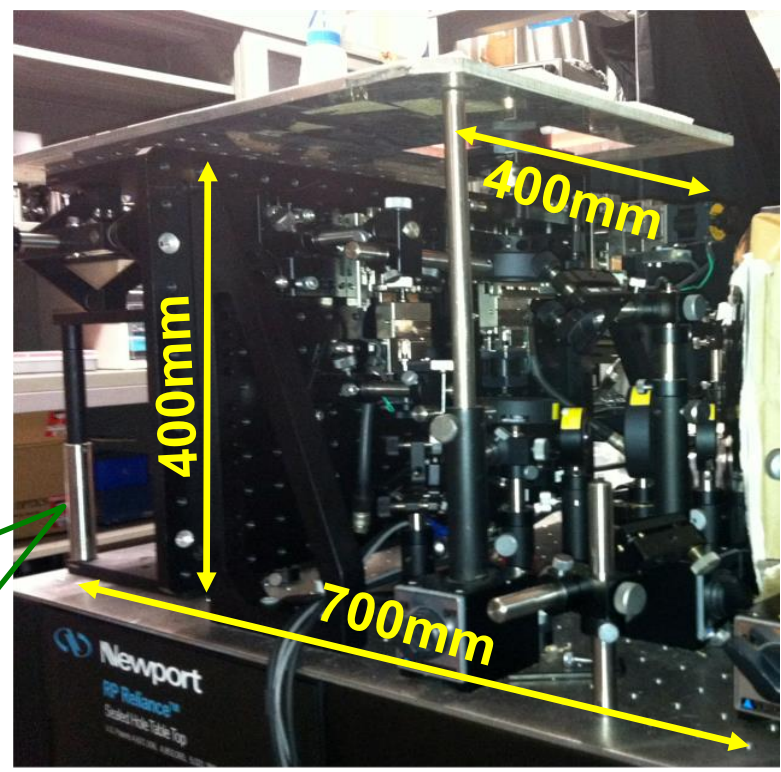
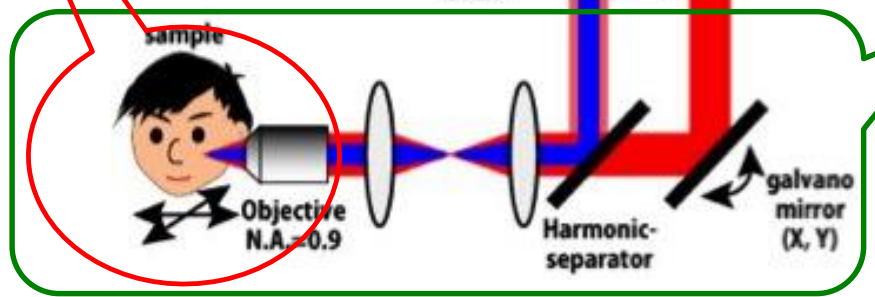
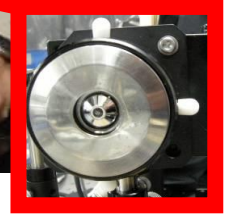
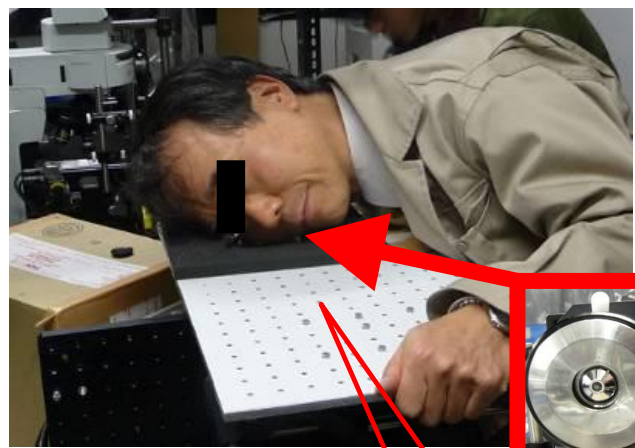
## 動物モデルを用いた熱傷治癒過程モニタリング



ref) T. Yasui et al. , *Proc. SPIE.* **8948**, 89480B (2014).

# 従来のSHG顕微鏡

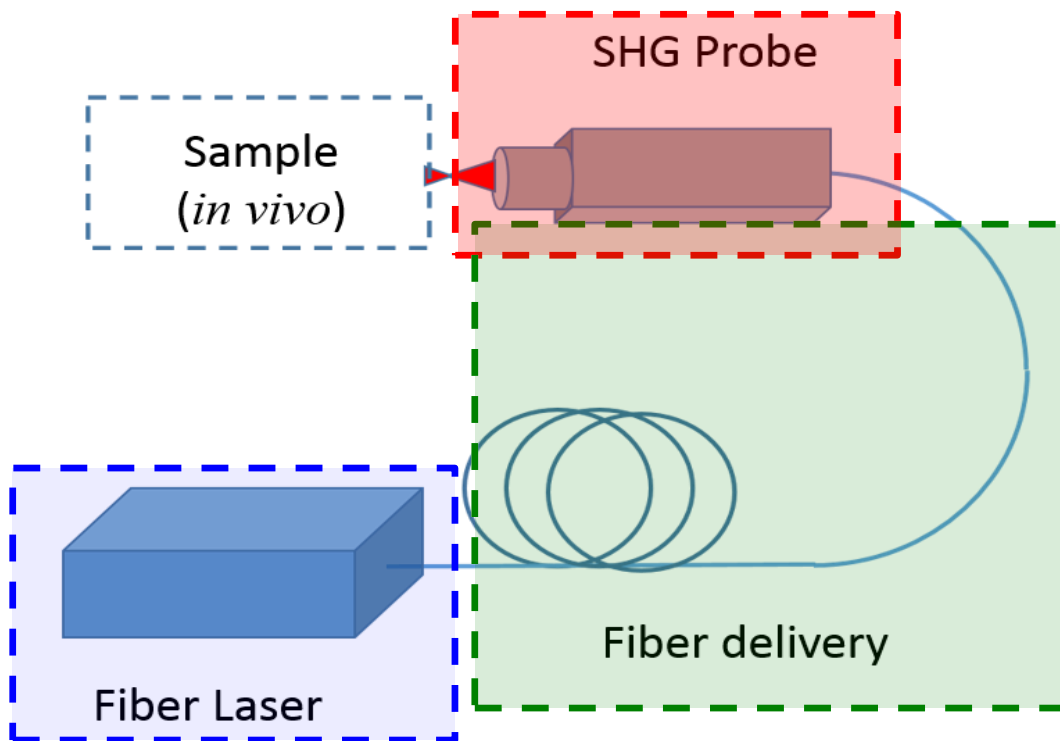
大型・複雑・自由空間伝播による利用制限



医療現場などにおける応用が困難

# 光ファイバー-SHG顕微鏡

## Present talk



## Key technologies

### 市販

- (1) 小型ファイバーレーザー光源
- (2) 超短パルス光のファイバー伝播(分散補償)

### 要開発

- (3) レーザー走査光学系のプローブ化

小型化・ロバスト・フレキシブル・アライメントフリー

# 小型プローブSHG顕微鏡

ケージ格納式ガルバノミラーにより完全に一体化！

パルス幅: 100 fs  
中心波長: 1250 nm  
繰り返し周波数: 73 MHz



ミラー駆動  
(X, Y)

ミラー径: 14.5\*8.5(mm)  
最大周波数: 1kHz

GM

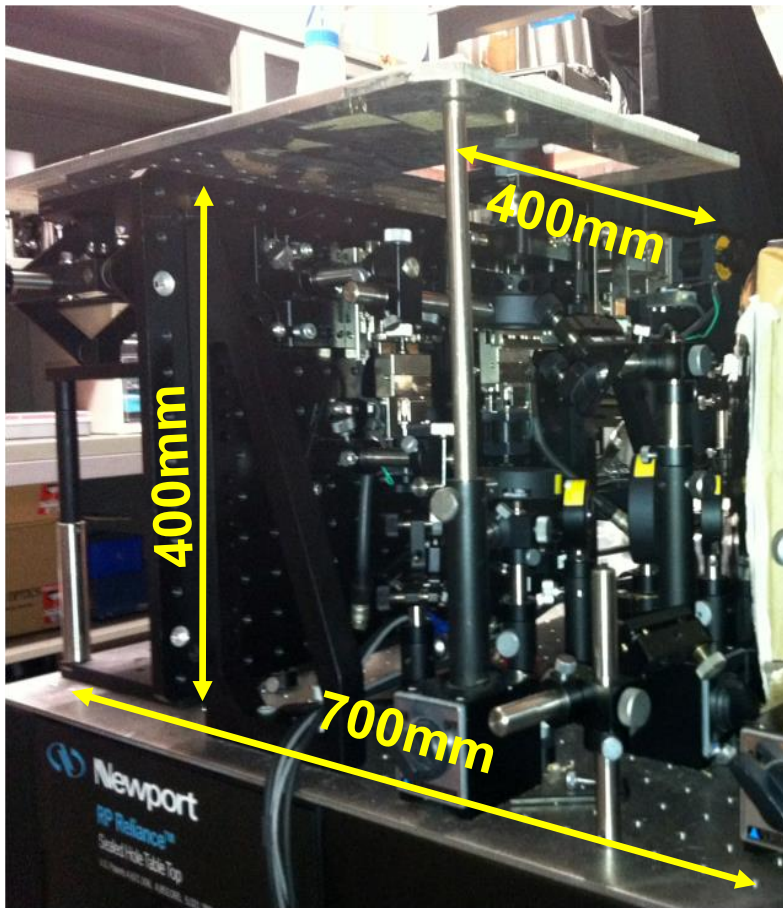
ノコギリ波  
(高速軸: 150Hz, 低速軸: 0.5Hz)



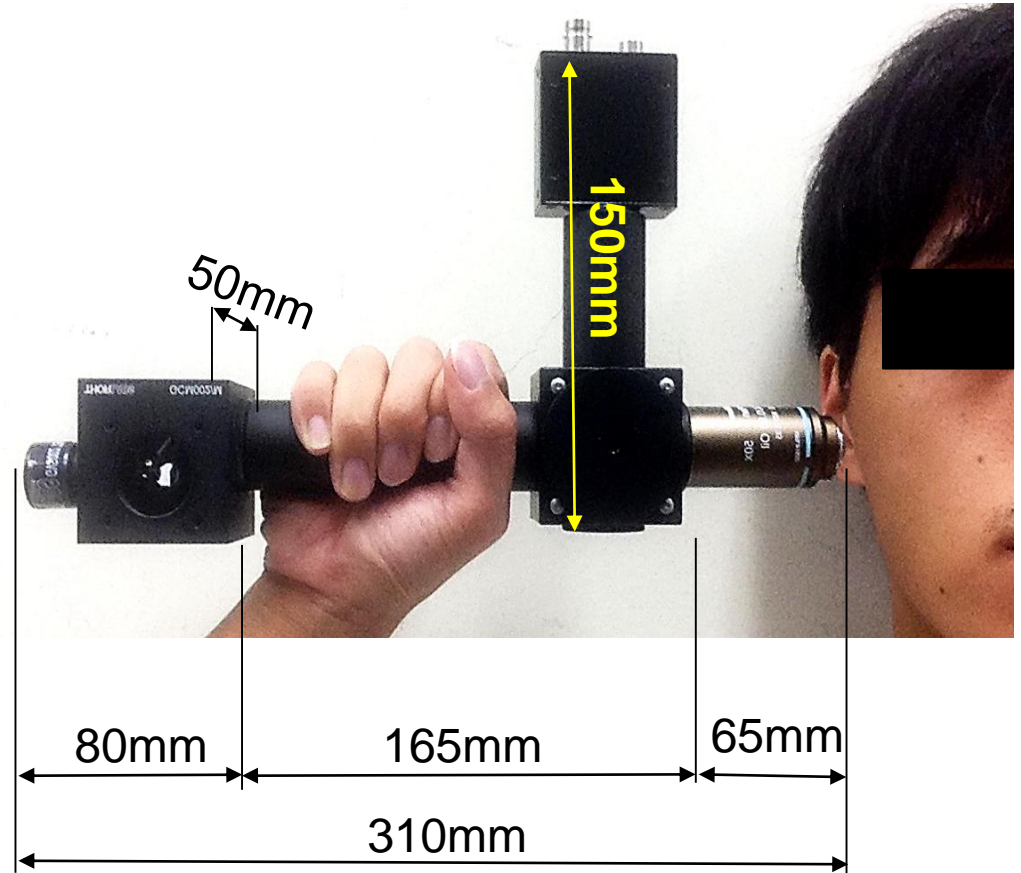


# SHG顕微鏡プローブ

従来系



SHG顕微鏡プローブ

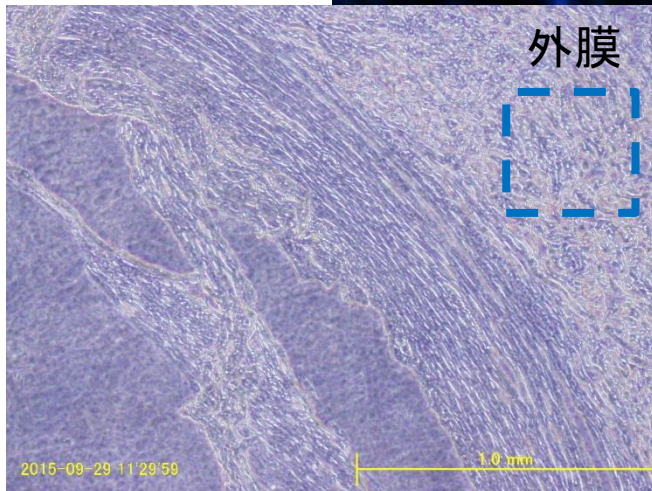
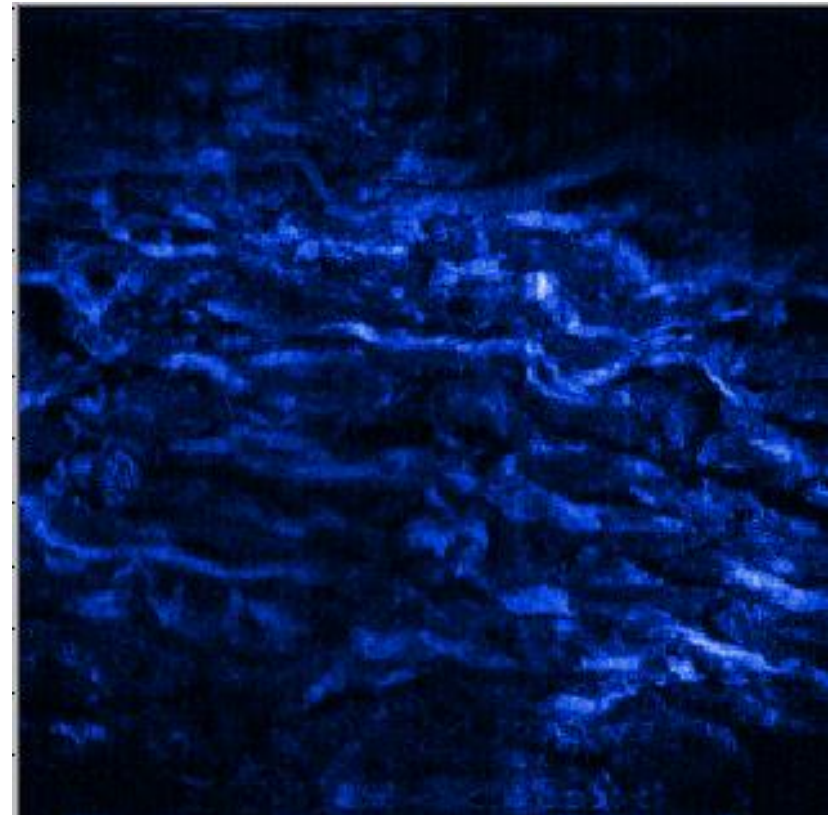
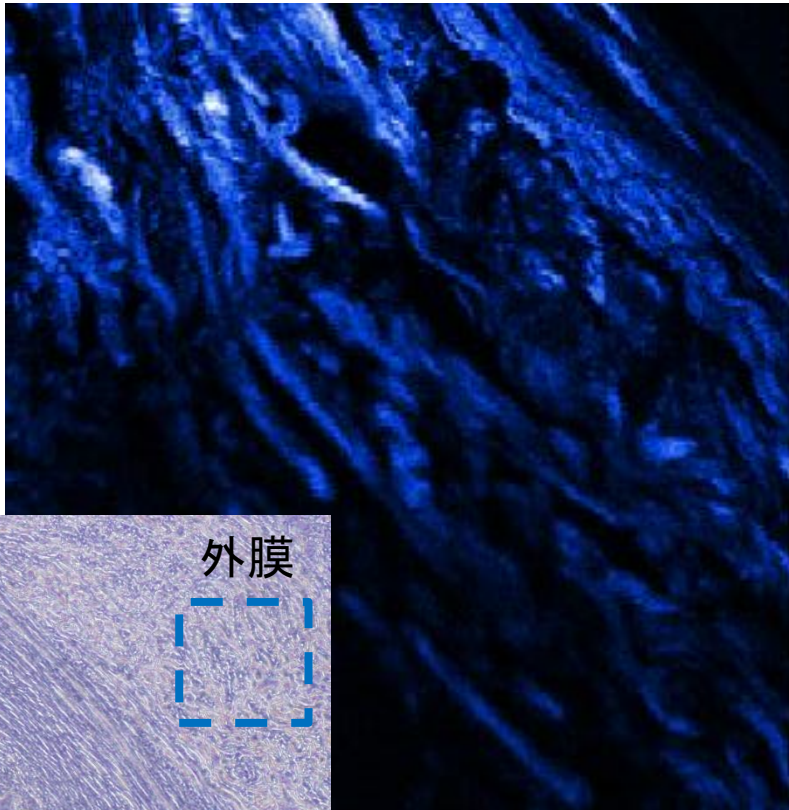
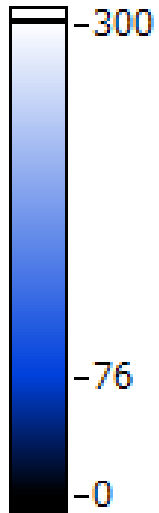


ハンドヘルドでの使用を目指す

# 切片サンプル “ex vivo”計測

従来系

小型プローブ系



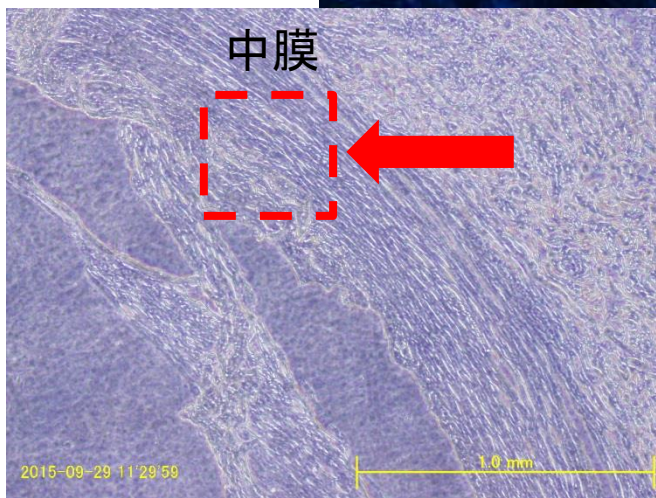
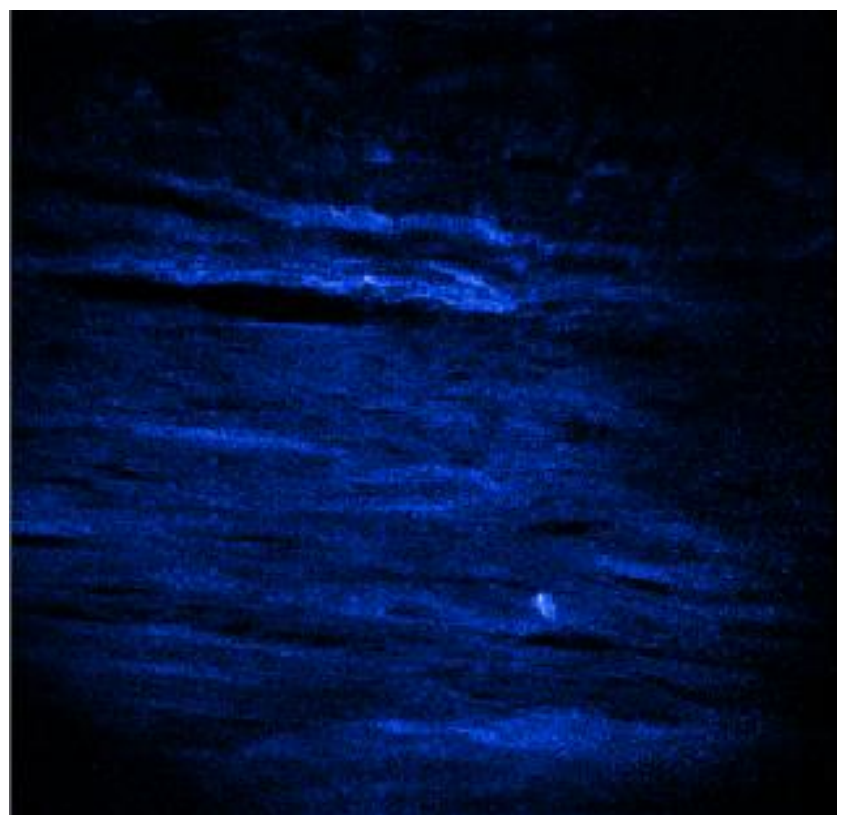
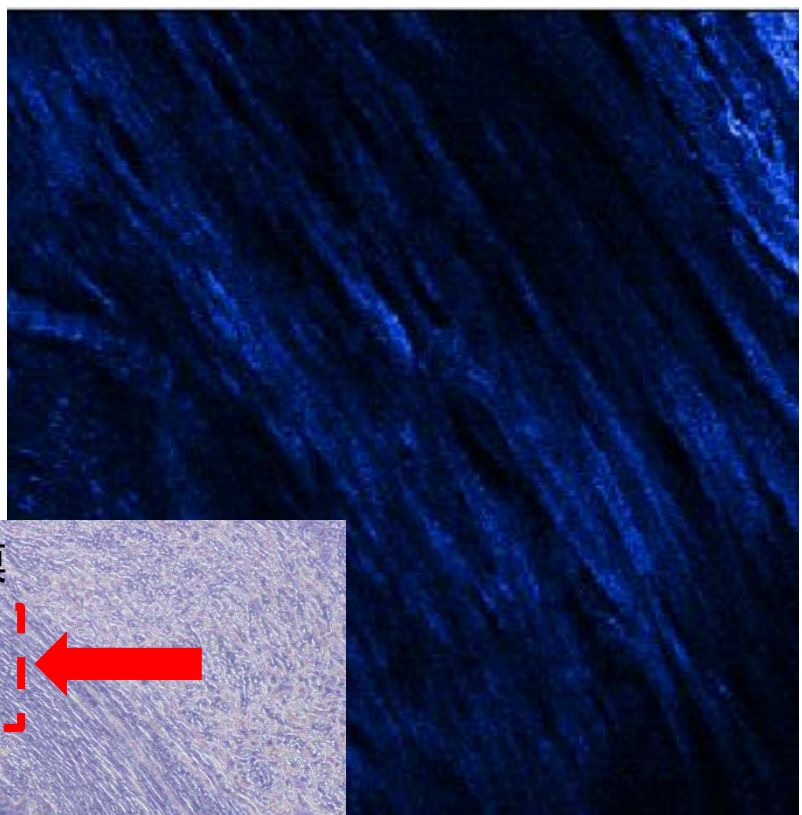
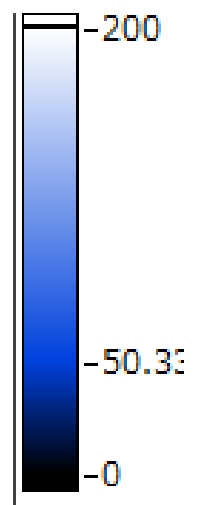
SHGイメージ  
視野：400 $\mu$ m\*400 $\mu$ m  
取得時間 = 2秒 照射パワー30mW

ヒト総腸骨動脈：位相差顕微鏡画像

# 切片サンプル “ex vivo”計測

従来系

小型プローブ系



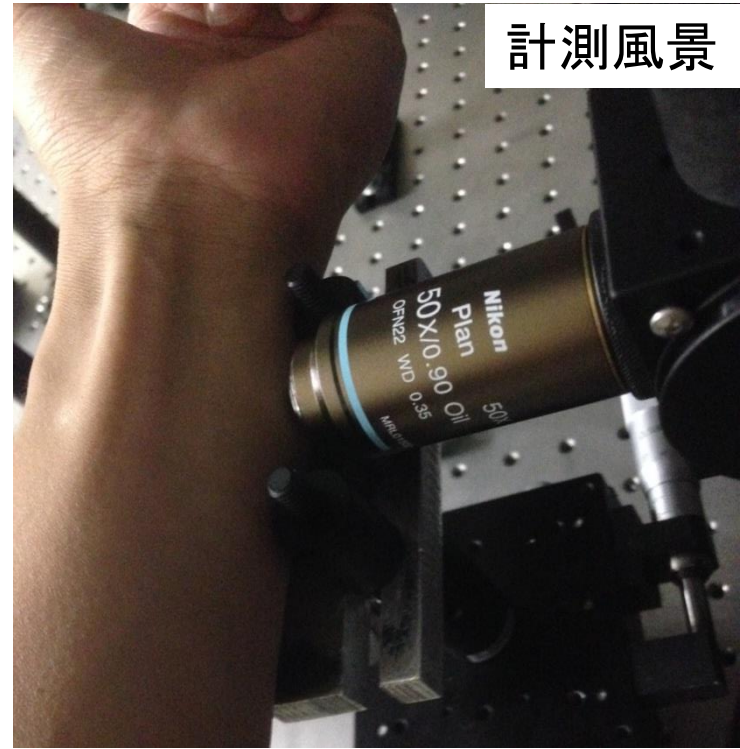
SHGイメージ  
視野：400μm\*400μm  
取得時間 = 2秒 照射パワー=30mW

ヒト総腸骨動脈：位相差顕微鏡画像

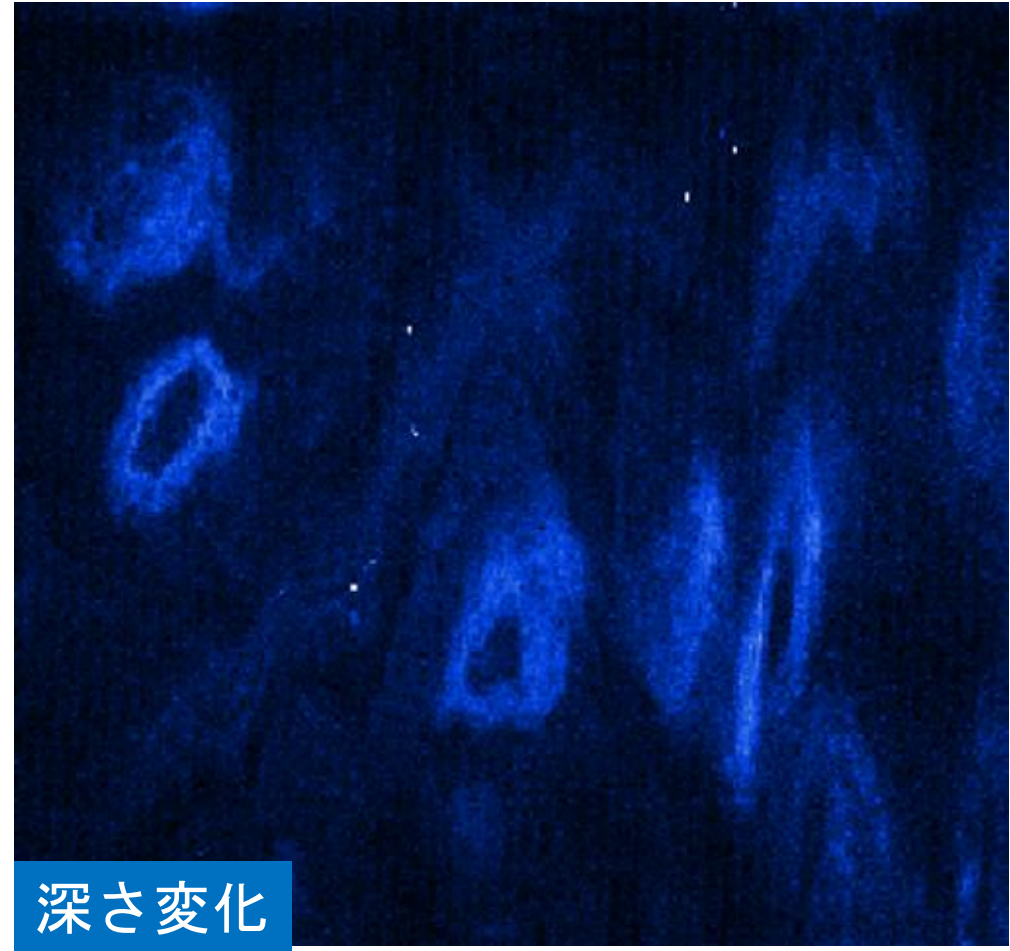
# “*in vivo*” イメージング

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部倫理委員会の承認(#14003)を得て実施

ヒト皮膚 (腕) @40mW(max.)



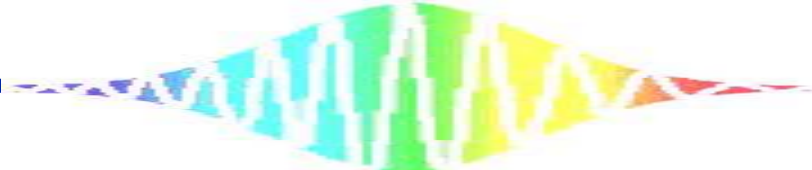
計測風景



深さ変化

視野 : 400 $\mu$ m\*400 $\mu$ m  
画像取得時間 = 2秒 / 枚

ヒト皮膚内の “生きたありのまま” のコラーゲンを可視化

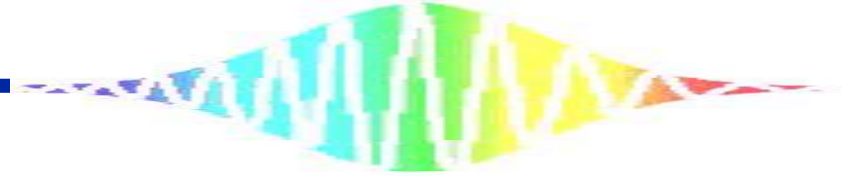


## まとめ

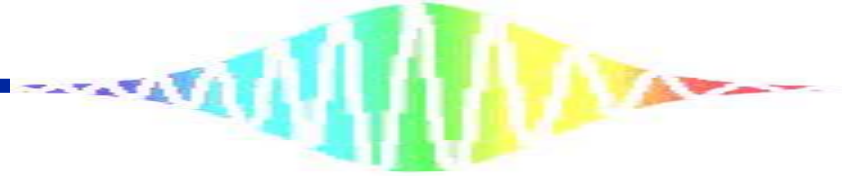
- ✓ 走査光学系を一体化した小型SHGプローブを開発した.
- ✓ 切片サンプルの”*ex vivo*” SHGイメージを取得
- ✓ ヒト皮膚の”*in vivo*” SHGイメージを取得

## 今後の予定

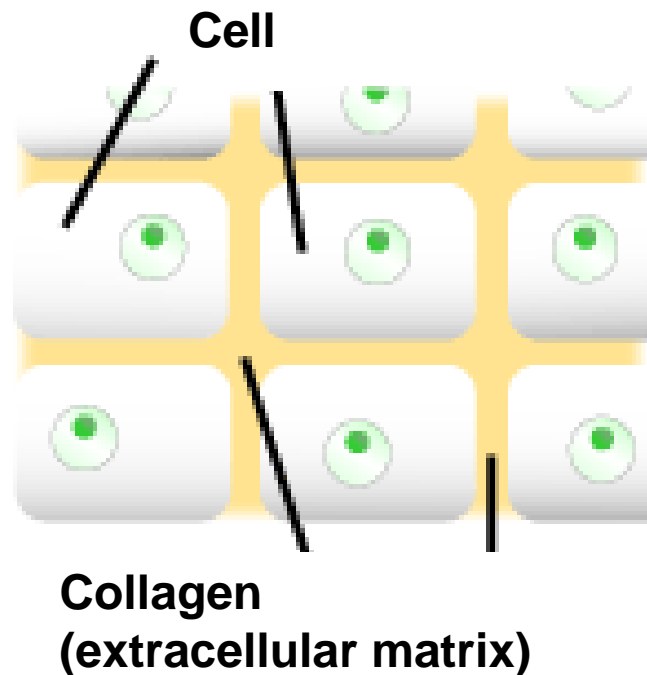
- 目標とする光ファイバーSHG顕微鏡を構築する.



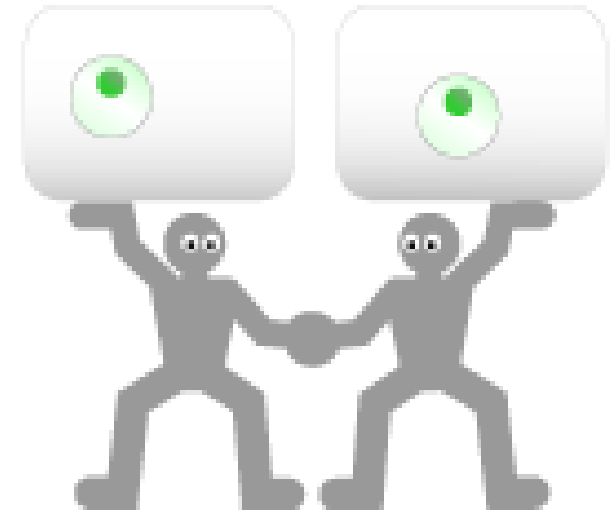
ご清聴ありがとうございました



# What is collagen?



*Collagen plays a role of "glue" to bind cells together or makes partitions between cells to put them in the right and well ordered position*

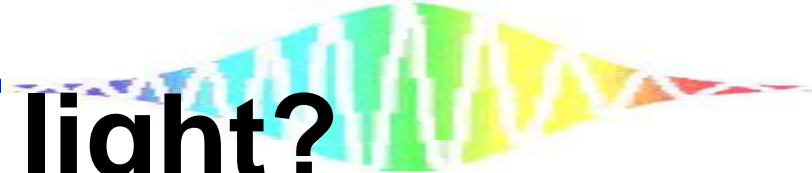


*Collagen plays an active role in binding and supporting cells!*

- Collagen makes up every part of body and supports, binds, detaches cells
- Collagen is a scaffold for cells. Cells divide and proliferate there

**Collagen makes significant influence on vital activity and aging**





# What is SHG light?

	Linear	Nonlinear
Sound (Keyboard)	<p>Sound (freq. = <math>f</math>)</p> <p>Touch</p>	<p><math>f</math>      <math>2f</math></p> <p><b>Strong Hit!</b></p>
Light	<p>CW light <math>\omega</math></p> <p>Reflected and scattered light <math>\omega</math></p> <p>Non centro-symmetric material</p>	<p>Ultraintense pulse light <math>\omega</math></p> <p>SHG light <math>2\omega</math></p> <p><math>\omega</math></p> <p>Non centro-symmetric material</p> <p>ex) anisotropic crystal, tissue collagen</p>